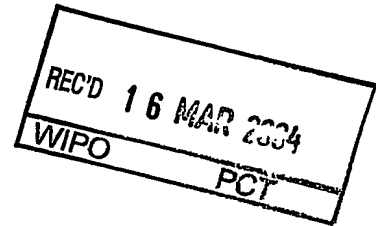


BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 103 12 842.5

Anmeldetag: 21. März 2003

Anmelder/Inhaber: Degussa AG, Düsseldorf/DE

Bezeichnung: Thermisch stabile Amidasen

IPC: C 12 N 9/78

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 17. Dezember 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

H. G. K. S.

Thermisch stabile Amidasen

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft neue Amidasen, die aus thermophilen Bakterien isoliert werden können, insbesondere aus thermophilen Actinomyceten, wie z. B. *Pseudonocardia thermophila*, wobei die erhaltenen Amidasen nicht nur eine hohe Temperaturstabilität besitzen, sondern sich auch durch die enantioselektive Umsetzung eines breiten Substratspektrums auszeichnen.

10

Enzymatische Verfahren halten zunehmenden Einzug in der Organischen Synthese, insbesondere bei der Durchführung enantioselektiver Synthesen, wie z. B. bei der Herstellung von optisch reinen pharmazeutischen Wirkstoffen, Aminosäuren, Acrylsäuren oder Hydroxamsäuren. Weiterhin sind Amidasen bei dem Abbau von xenobiotischen Verbindungen beteiligt.

15

Amidasen katalysieren dabei die Umsetzung von Amiden zu ihren korrespondierenden Carbonsäuren und Aminen bzw. zu Ammoniak. Inzwischen konnten eine Reihe von bakteriellen Amidasen identifiziert werden, darunter auch einige Amidasen aus mesophilen Actinomyceten (Bhalla, T.C., et al.; Science letters 11-12; 139-141, 1997; Hirrlinger, B.; et al. J. Bacteriol. 178, 3501-3507, 1996; Kobayashi, M., et al.; Eur. J. Biochem., 217, 327-336, 1993 ; Kotlova, E. K.; et al. ; Biochemistry (Mosc.) 64, 384-389, 1999 ; Mayaux, J.F. et al. ; J. Bacteriol. 173, 6694-6704, 1991; Mayaux, J.F.; J. Bacteriol. 172, 6764-6773, 1990; Nawaz, M.S., et al.; Appl. Environ. Microbiol., 60, 3343-3348, 1994), wobei allerdings keine thermostabile Amidase beschrieben wurde.

20

25

30

Thermoaktive Amidasen wurden demgegenüber bisher nur in *Klebsiella pneumoniae* NCTR 1 (Nawaz, M.S.; J. Bacteriol. 178, 2397-2401, 1996) und in *Sulfolobus solfataricus* (d'Abusco, A.S.; Extremophiles, 5, 183-192, 2001) gefunden. Gerade die Bereitstellung von weiteren Amidasen, insbesondere von thermostabilen Amidasen wäre allerdings von großem technischen Interesse, da

sich mit solchen Enzymen ein breiteres Spektrum an technisch durchführbaren enzymatischen Umsetzungen erschließt. Der vorliegenden Erfindung lag daher Aufgabe zu Grunde neue, thermisch stabile Amidasen bereit zu stellen.

- 5 Die Aufgabe wird durch Amidasen gelöst, die eine N-terminale Sequenz (**SEQ ID No. 1**)

I H M P D P D A V (**SEQ ID No. 1**)

und / oder eine Aminosäuresequenz

10

D G L P V G L M I V G K H F (**SEQ ID No. 2**)

oder eine Sequenz mit einer Homologie von über 50%, bevorzugt von über 70%, besonders bevorzugt von über 80%, zu **SEQ ID No. 1** und / oder **SEQ ID No. 2** enthalten.

15

Die neuen Amidasen sind z. B. aus thermophilen Bakterien, insbesondere aus thermophilen Actinomyceten, wie z. B. aus *Pseudonocardia thermophila* erhältlich. So kann eine in *Pseudonocardia thermophila* konstitutiv exprimierte Amidase mit einem Molekulargewicht zwischen 47 und 53 kDa isoliert werden, die bevorzugt als Trimer mit einem Molekulargewicht zwischen 140 und 160 kDa auftritt.

20

Die Identifikation weiterer mutanter oder alleler Varianten der Amidasen kann z. B. anhand von Nukleinsäuresonden erfolgen, die zu einer DNA-Sequenz, codierend für die Aminosäuresequenz **SEQ ID No. 1** oder **SEQ ID No. 2**, komplementär sind.

25

Die Hybridisierung einer solchen Sonde erfolgt dabei unter stringenten Bedingungen, z. B. bei 60°C, 0,1xSSC, 0.1% SDS.

30

Die gefundenen nativen Amidasen können zwar durch die N-terminale Sequenz **SEQ ID No. 1** und die **SEQ ID No. 2** oder einer homologen Variante davon identifiziert werden, aber für die Amidaseaktivität ist zumindest die N-terminale Sequenz nicht zwingend erforderlich. Daher umfasst die vorliegende Erfindung auch solche, oben beschriebenen Amidasen, deren N-terminales Ende künstlich

deletiert ist. Ebenso kann auch die Teilsequenz **SEQ ID No. 2** künstlich deletiert werden.

Die beschriebenen Amidasen können aus einem zellfreien Rohextrakt thermophiler Bakterien, der z. B. durch Ultraschallaufschluss von *Pseudonocardia thermophila* Zellen in einem Phosphatpuffer erhältlich ist, wie folgt gereinigt werden:

- a) Zentrifugation des Rohextraktes bei 10000 bis 20000 rpm und anschließende Zugabe einer 1 M Salzlösung,
- b) chromatographische Trennung des Überstandes an einer hydrophoben Säule mit einem reversen Gradienten einer Salzlösung von 1 M bis 0 M,
- c) Ultrafiltration der aus b) erhaltenen Fraktion, die Amidaseaktivität zeigt, an einer 10 kDa cut off Membran,
- d) Ionenaustauschchromatographie der aus c) erhaltenen Proteinfraction mit einem Gradienten von 0 M bis 0,5 M einer Salzlösung,
- e) Chromatographie der aus d) erhaltenen Fraktion, die Amidaseaktivität zeigt, mit einer 0,1%igen Salzlösung und entsalzen der gereinigten Amidasefraktion.

Bevorzugt werden Alkalihalogenid-Salzlösungen, wie z. B. NaCl oder KCl - Lösungen zur Durchführung der einzelnen chromatographischen Reinigungsschritten verwendet. Die chromatographischen Trennungen werden bevorzugt zwischen pH 6,5 und 8,0 durchgeführt, wobei der pH-Wert, z. B. durch Verwendung eines Standard Phosphatpuffers (pH 7,2) eingestellt werden kann. Die Ionenaustauschchromatographie wird bevorzugt bei einem pH-Wert zwischen 7,5 und 8,5 durchgeführt.

Die Amidaseaktivität der erhaltenen Fraktionen kann mit Hilfe eines Hydrolyse-Tests bestimmt werden, wobei als Substrat Benzamid verwendet werden kann. Die enzymatisch entstehenden Produkte, Benzoessäure und Ammoniak, können mittels HPLC (Benzoessäure) bzw. mit der Phenyl-hydrochlorid Methode (Nachweis von Ammoniumionen) bestimmt werden.

Die so gewonnenen erfindungsgemäßen Amidasen zeichnen sich durch eine hohe Temperaturstabilität aus. Die spezifische Aktivität des Enzyms leidet bei kürzeren Reaktionszeiten von mehr als einer Stunde erst bei Temperaturen um 80 °C signifikant. Weiterhin besitzen die beschriebenen Amidasen ein

5 Temperaturoptimum zwischen 50 und 75 °C. Die beschriebenen Amidasen zeigen darüber hinaus eine nennenswerte Aktivität zwischen 30 und 85 °C, bevorzugt sind die Enzyme allerdings bei Reaktionstemperaturen zwischen 60 und 70 °C verwendbar.

10 Weiterhin bleibt auch die Spezifische Aktivität der erfindungsgemäßen Amidasen über einen weiten pH-Wertbereich erhalten. So besitzen die Amidasen eine signifikante enzymatische Aktivität zwischen pH 3,5 und pH 11,5, wobei die spezifische Aktivität vom Optimum zwischen pH 6,0 und 7,5 über den Bereich von pH 4,5 und 10,0 kaum abfällt.

15 Durch das hohe Temperaturoptimum, die gute thermische Stabilität und den großen pH-Wertbereich in dem die Enzyme aktiv sind, erschließt sich ein interessanter Spielraum für die Optimierung Amidase katalysierter Prozesse, wie der Hydrolyse von Amiden.

20 Es kann darüber hinaus gezeigt werden, dass die hier beschriebenen Amidasen unempfindlich gegenüber einer großen Zahl von Reagenzien und Ionen sind. So sind die Amidasen z. B. unempfindlich gegenüber Chelatbildnern wie z. B. EDTA oder gegenüber Detergenzien wie SDS oder Triton. Auch die Abhängigkeit von
25 ionischen Co-Faktoren scheint nicht gegeben zu sein. Durch Zugabe von DTT kann sogar die enzymatische Aktivität der Amidasen gesteigert werden.

Die gewonnenen und charakterisierten erfindungsgemäßen Amidasen unterscheiden sich in ihren Eigenschaften deutlich von den bisher bekannten
30 mikrobiellen Amidasen, wie aus der exemplarischen Zusammenstellung in Tab. 4 ersichtlich ist. Es ist dabei insbesondere bemerkenswert, dass das isolierte Enzym aus *Pseudonocardia thermophila* die erste bekannte natürlich vorkommende homotrimere Amidase ist.

Tab. 4

Mikroorganismus	Charakterisitka							
	Expression	Molmasse in kDa	Unterein- heiten kDa (Anzahl)	pH-Opt.	T-Opt. in °C	IEF Punkt pH	Metall Co- Faktoren	Substrat- spezifität (Amide)
<i>Pseudonocardia thermophila</i>	konstitutiv	150	50 (3)	7.0	70	4.2	n.d.	Al, Ar, Cy, As
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> d3 ^{a)}	induzierbar	490	63 (8)	7.5	22	n.d.	n.d.	Al, Ar
<i>Bacillus stearothermophilus</i> ^{b)}	induzierbar	39	monomer	7.0	55	n.d.	n.d.	Al
<i>Brevibacterium</i> sp. R312 ^{c)}	induzierbar	110	43 (2)	7.5	30	n.d.	n.d.	Arylpropioamid
<i>Comamonas acidovorans</i> KPO ^{d)}	konstitutiv	54	monomer	8.0	30	n.d.	n.d.	Ketoprofen
DSM 6320 ^{e)}	induzierbar	125	66 (2)	8.5	40	4.2	n.d.	L-Carnitin
<i>Helicobacter pylori</i> ^{f)}	konstitutiv	40	monomer	7.0	55	n.d.	n.d.	Al
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTR1 ^{g)}	induzierbar	62	monomer	7.0	65	n.d.	Co&Fe	Al
<i>Mycobacterium neoaurum</i> ^{h)}	konstitutiv	136	40 (4)	8.0	50	4.2	n.d.	Al, As
<i>Mycobacterium smegmatis</i> ⁱ⁾	konstitutiv	50	monomer	7.5	22	n.d.	n.d.	Cy
<i>Ochrobactrum anthropi</i> SV3 ^{j)}	induzierbar	40	63 (8)	9.0	22	n.d.	n.d.	As
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^{k)}	induzierbar	200	monomer	7.0	55	n.d.	n.d.	Al

Tab. 4 Fortsetzung

Mikroorganismus	Charakteristika							
	Expression	Molmasse in kDa	Unterein- heiten kDa (Anzahl)	pH- Opt.	T-Opt. in °C	IEF Punkt pH	Metall Co- Faktoren	Substrat- spezifität (Amide)
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> B23 ^{l)}	induzierbar	105	54 (2)	7.0	50	n.d.	no metal	Al, Ar, Cy, As
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> J1 ^{m)}	induzierbar	110	55 (2)	7.9	55	n.d.	n.d.	Al, Ar, Cy, As
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> M8 ⁿ⁾	konstitutiv	150	42 (4)	7.0	55	n.d.	n.d.	Al
<i>Rhodococcus erythropolis</i> MP50 ^{o)}	induzierbar	480	61 (8)	7.5	55	n.d.	n.d.	Al, Ar, Cy
<i>Rhodococcus</i> sp. ^{p)}	konstitutiv	360	44,5 (8)	8.5	40	4.0	Fe	Al
<i>Rhodococcus</i> sp. NHB-2 ^{q)}	induzierbar	n.d.	n.d.	8.0	55	n.d.	n.d.	Al
<i>Rhodococcus</i> sp. ^{r)}	induzierbar	118	48,5 (2)	7.5	30	n.d.	n.d.	Ar/propion- amid
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ^{s)}	induzierbar	38	monomer	6.0	40	5.8	n.d.	As, Peptide
<i>Sulfolobus solfataricus</i> ^{t)}	induzierbar	56	monomer	7.5	95	5.94	n.d.	Al, Ar, Cy

Al = Aliphatische Amide, Ar = Aromatische Amide, Cy = Cycloische Amide, As = Aminosäureamide, n.d. = nicht bestimmt

a) Troit et al.; Mikrobiology 147, 1815-1824, 2001 ; b) Cheong, et al., Enzyme Microb. Technol. 26, 152-158, 2000 ; c) Mayaux et al., J. Bacteriol. 172, 6764-6773, 1990 ; d) Yamamoto et al., Appl. & Environ. Microbiol. 1, 152-155, 1996; e) Joeres et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 40, 606-610, 1994, f) Skouloubis, et al., Mol. Microbiol. 25, 989-998, 1997 ; g) Nawaz et al., J. Bacteriol. 178, 2397-2401, 1996 ; h) Hermes et al., Appl. & Environ. Microbiol. 1, 153-159, 1994; i) Boshoff et al., J. Bacteriol. 180, 5809-5814, 1998; j) Komeda et al., Eur. J. Biochem. 267, 2028-2035, 2000 ; k) Nawaz et al., Appl. Biochem. & Biotechnol. 28/29, 865-875, 1991; l) Ciskanik et al., Appl. Environ. Microbiol. 61, 998-1003, 1995, m) Kobayashi et al., Eur. J. Biochem., 217, 327-336, 1993 ; n) Koltova et al., Biochemistry (Moscow), 64, 384-389, 1999 ; o) Hirrlinger et al., J. Bacteriol. 178, 3501-3507, 1996 ; p) Nawaz et al., Appl. Environ. Microbiol. 60, 3343-3348, 1994; q) Bhalla et al., Science letters, 11-12, 139-142, 1997 ; r) Mayaux et al., J. Bacteriol., 173, 6694-6704, 1991 ; s) Neumann et al., Appl. Microbiol. & Biotechnol. 58, 773-780, 2002; t) d'Abusco et al., Extremophiles, 5, 183-192, 2001

Ein großer Vorteil der neuen Amidasen ist deren breites Substratspektrum. So lassen sich mit den Enzymen sowohl aliphatische, aromatische, cyclische, heterocyclische und Aminosäureamide hydrolysieren. Wobei insbesondere aliphatische Amide mit ein bis zehn Kohlenstoffatomen, aromatische Amide mit 5 bis 12 Kohlenstoffatomen, heterocyclische Amine mit 4 bis 10 Kohlenstoffatomen und mit ein bis vier Heteroatomen, z. B. ausgewählt aus der Gruppe N, S, O, P oder L-Aminosäureamide umgesetzt werden können.

Die beschriebenen Amidasen zeichnen sich neben dem breiten Substratspektrum auch durch eine hohe Enantioselektivität aus. Insbesondere die Herstellung von S-Enantiomeren, wie z. B. von (hetero-)cyclischen Säuren und insbesondere aromatischen, aliphatischen oder aromatisch-aliphatischen Säuren, ist bevorzugt.

Kurze Beschreibung der Figuren:

Fig. 1 zeigt die Ergebnisse einer SDS-PAGE Elektrophorese mit unterschiedlichen Enzymproben, die während der Aufreinigung entnommen wurden (Bahnen 2 bis 5). Die Bahnen 6 und 7 zeigen ein Zymogram des Rohextraktes und der aufgereinigten Probe. Bahn 1 ist ein Molekulargewichtsstandard.

Fig. 2 zeigt das Ergebnis der Molekulargewichtsbestimmung der nativen Amidase mittels Gelfiltration. Fig. 3 zeigt die Spezifische Aktivität einer erfindungsgemäßen, gereinigten Amidase in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur, Fig. 4 in Abhängigkeit vom pH-Wert. Fig. 5 zeigt die Stabilität der gereinigten Amidase bei unterschiedlichen Temperaturen. In Fig. 6 ist die Acetyltransferase-Aktivität bezogen auf beispielhafte Substrate wiedergegeben. In Fig. 7 ist die enantioselektive enzymatische Umsetzung mit 2-Phenylpropionamid als Substrat gezeigt.

Im folgenden werden einige Ausführungsbeispiele gegeben, die allerdings nicht einschränkend zu verstehen sind.

Beispiel 1: Kultivierung von *Pseudonocardia thermophila* (DSMZ 43832)

Der verwendete *Pseudonocardia thermophila* Stamm wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Germany) bezogen. Die Zellen wurden, sofern nichts anderweitig erwähnt ist, wie in Yamaki, T.; et al.; J. Ferment. Bioeng., 83, 474-477, 1997 beschrieben, kultiviert. Das Medium (pH 7.2) enthält pro Liter: 5g Hefeextrakt, 4g lösliche Stärke, 0,3g KH_2PO_4 , 0,6g Na_2HPO_4 , 0,1g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5g NaCl. Die Zellen wurden nach 3 Tagen Kultivierung in einem Schüttelkolben bei 50 °C, 150 rpm geerntet. Die Ausbeute betrug 10g Zellen (Nassgewicht) pro Liter Medium.

Beispiel 2: Reinigung der Amidase:

Die Aufreinigung der Amidase erfolgte bei Raumtemperatur. 7g Zellmaterial (Nassgewicht) wurden dazu 2 mal mit 60 mM K-Na Phosphatpuffer (Standardpuffer), pH 7.2 gewaschen, in 50 ml des Puffers resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 13000rpm, wurde eine 1 M KCl-Lösung zu dem zellfreien Extrakt gegeben. Der Überstand (50ml) wurde auf eine hydrophobe Phenyl-Sepharose Fast Flow Säule (Pharmacia, Sweden) gegeben, die mit einem 1 M KCl Standardpuffer equilibriert war. Das Protein wurde dann mit einem linearen reversen Gradienten einer 1 M KCl bis 0 M KCl -Lösung eluiert. Die Amidase enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und gegen 2 L Standardpuffer (pH 8,0) dialysiert. Anschließend wurde die erhaltene Proteinfraction auf das 12-fache konzentriert und durch eine 10 kDa cut-off Membran (Amicon) ultrafiltriert. Die Probe wurde dann über eine Ionenaustausch-Chromatographie weiter gereinigt. Dazu wurde eine UNO-Q12 Säule (BioRad) verwendet, wobei das gereinigte Protein mit Hilfe eines linearen NaCl-Gradienten (0 bis 0,5 M NaCl in Standardpuffer pH 8,0) gereinigt wurde. Die enzymatisch aktiven Fraktionen wurden vereinigt, 2-fach konzentriert und über eine preparative HiLoad 26/60 Superdex 200 Säule (Pharmacia, Sweden), mit Standardpuffer, pH 7,2, enthaltend 0,1% NaCl, fraktioniert. Die Proteinfraction mit Amidaseaktivität wurden gesammelt und über eine Sephadex PD-10 Säule

(Pharmacia, Sweden) entsäzt. Die Proteinkonzentration wurde mit Rinderserumalbumin als Standard, wie in Bradford, M.M.; Anal. Biochem. 71, 248-254, 1976 beschrieben, bestimmt.

5 Das Ergebnis der Reinigung ist in Figur 1 und Tabelle 1 dargestellt.

Der Reinigungserfolg wurde dabei mit einer sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide (SDS-PAGE) Gelelektrophorese überprüft. Dazu wurde ein vorgefertigtes Gel (Novex, Invitrogen, Niederlande) mit einem Tris-Glycin Gradienten von 4-20% verwendet. Als Standardproteine wurden Phosphorilase b
10 (94kDa), Bovine Albumin (67kDa), Chicken Ovalbumin (43kDa), Carbonic Anhydrase (30kDa), Soybean Trypsin Inhibitor (20.1kDa) und Bovine α -Lactalbumin (14.4kDa) (Pharmacia, Schweden) verwendet. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie Blue R-250 angefärbt.

15

Um die Amidaseaktivität auf dem Gel zu verifizieren wurde das SDS-Gel in 2,5% Triton X-100 60 Minuten gewaschen und anschließend 30 Minuten bei 60 °C in K-Na-Phosphat Puffer (pH 7,0) enthaltend 70 mM Propionamid und 0,7 M Hydroxylaminhydrochlorid, wobei der pH-Wert mit 10 M NaOH auf 7,0 eingestellt
20 wurde, inkubiert. Das Gel wurde danach in Wasser gewaschen und mit einer sauren Eisenchlorid-Lösung (0.1 M FeCl₃ in 0.5 M HCl) bedeckt.

Das aufgetragene Eisen reagiert mit der enzymatisch entstehenden Hydroxamsäure unter Bildung einer rot-braunen Bande. Die Intensität der Färbung
25 entspricht der enzymatischen Aktivität der Amidase. Der eben beschriebene Aktivitätstest wird im folgenden in der Beschreibung auch als Zymogram bezeichnet.

Fig. 1 zeigt die Ergebnisse einer SDS-PAGE Elektrophorese mit unterschiedlichen Proben (jeweils 5 μ g Protein), aus den während der Reinigung erhaltenen Fraktionen. Die Proteine wurden mit Coomassie Blue angefärbt. Die Bahn 1 zeigt
30 die Standardproteine, Bahn 2 den Rohextrakt, Bahn 3 eine Probe nach Reinigung

an der Phenyl-Sepharose Säule, Bahn 4 eine Probe nach Ionenaustausch-Chromatographie an einer UNO Q12 Säule, Bahn 5 eine Probe nach Reinigung an einer Superdex 200 Säule. Die Bahnen 6 und 7 zeigen das Zymogram des Rohextraktes und der aufgereinigten Probe.

5

Tab.1: Ergebnisse zur Reinigung der Amidase aus *Pseudonocardia thermophila*.

Reinigungsschritt	Protein in mg (gesamt)	Gesamtaktivität (U) ^a	Spezifische Aktivität (U)	Ausbeute (U x mg ⁻¹)	Reinigungsgrad
Rohextrakt ^b	85	34.7	0.4	100	1-fach
Phenyl-Sepharose	4.4	25.2	5.7	72.6	14-fach
UNO Q12	2.0	16.8	8.5	48.3	21-fach
Superdex 200	0.46	9.1	19.5	26.2	48-fach

a) Ein U der Amidase katalysiert die Bildung von 1 µmol Benzoesäure pro Minute und pro mg Protein unter Standardbedingungen.

b) Nach Kultivierung bei 50°C, Zentrifugation der 1-Liter-Kultur (7g Zellmaterial (Nassgewicht)), zweimaliges Waschen mit Standardpuffer (pH 7,2) und Ultraschallaufschluss.

10

Mit dem beschriebenen Reinigungsverfahren wurde die enzymatisch aktive Amidase mit einer Ausbeute von 26,2 % erhalten. Die Spezifische Aktivität betrug 19,5 U/mg Protein bezogen auf Benzamid als Substrat. Die Amidaseaktivität wurde durch eine HPLC-Analyse der Produkte des enzymatisch umgesetzten Benzamids bestätigt.

15

Beispiel 3: Bestimmung des Molekulargewichts der Amidase

Das Molekulargewicht der Amidase wurde mittels Gelfiltration an einer Superdex 200 Säule (Amersham) unter Verwendung eines 60 mM K-Na-Phosphatpuffers (pH 7,2), enthaltend 0,1% NaCl, bestimmt. Die Säule wurde mit Blue Dextran (2000 kDa), Sweet Potato β-Amylase (200 kDa), Yeast Alcohol Dehydrogenase (150 kDa), Bovine Serum Albumin (66 kDa), Carbonic Anhydrase (29 kDa) und Cytochrome c (12,4 kDa) (Sigma Aldrich, Deutschland) kalibriert.

25

Das Molekulargewicht des nativen Proteins wurde so auf ca. 147 kDa bestimmt (siehe dazu Fig. 2, Bahn 2). Zur Überprüfung der enzymatischen Aktivität des gereinigten Proteins wurde ein Zymogram (Bahn 1) erstellt. Bahn 3 enthält den Molekulargewichtsstandard.

5

Demgegenüber wurde das Molekulargewicht des Enzyms mittels SDS-PAGE Elektrophorese auf 50 kDa bestimmt (siehe dazu Fig. 1). Die enzymatische Aktivität wurde anhand des Zymograms (Bahn 6, Rohextrakt und Bahn 7, gereinigtes Enzym) überprüft.

10

Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die gereinigte Amidase bevorzugt als Trimer aus drei identischen ca. 50 kDa großen Untereinheiten vorliegt.

15

Beispiel 4: Bestimmung des isoelektrischen Punktes

Der isoelektrische Punkt wurde mittels isoelektrischer Fokussierung mit einem Novex Polyacrylamidgel (pH3-10) und unter Verwendung einer Novex Elektrophoresekammer anhand den Angaben des Herstellers (Novex, Invitrogen, Niederlande) bestimmt. Der isoelektrische Punkt der gereinigten Amidase wurde so mit pH 4,2 ermittelt.

20

Beispiel 5: N-terminale Sequenzierung der gereinigten Amidase

Die gereinigte Amidase wurde vom SDS-PAGE Gel durch Elektroblothing auf eine PVDF blotting Membran überführt. Die Aminosäuresequenz des N-terminalen Endes des so erhaltenen Enzyms wurde mittels Edman-Abbau bestimmt. Erhalten wurde die **SEQ ID No. 1**.

25

Ein Sequenzvergleich mit anderen N-terminalen Enden bekannter Amidasen ergab keine signifikanten Homologien.

30

Weiterhin wurde die gereinigte trimere Amidase einer Endoproteinase Asp-N Spaltung unterworfen. Im Anschluss kann aus dem ca. 150 kDa Protein ein Peptid mit der Masse 1482u isoliert werden, dass mittels Edman-Abbau sequenziert wurde. Erhalten wurde die **SEQ ID No. 2**.

5

Beispiel 6: Enzym-Assays

Allgemeines: Assay zur Bestimmung der hydrolytischen Aktivität

10 Zur Durchführung des Hydrolyse-Assays wurde, sofern nicht anders erwähnt, eine 5 mM Benzamid-Lösung in 500 µl eines 60 mM K-Na-Phosphatpuffers, pH 7,2, verwendet. Die enzymatische Umsetzung erfolgte eine Stunde bei 70 °C unter Zugabe von 5 µg des Enzyms. Die Reaktion wurde durch Kühlung des Reaktionsansatzes auf Eis gestoppt. Die Konzentration der enzymatisch erhaltenen Produkte (Benzoessäure und Ammoniak) wurde mittels HPLC und
15 spektrometrisch unter Verwendung des Ammoniak Kits Spectroquant 114752 (Merck, Deutschland) bestimmt.

Eine Unit (U) an Amidaseaktivität wird definiert als die Enzymmenge, die die Bildung von 1 µmol Benzoessäure pro Minute katalysiert.

20

Assay zur Bestimmung der Acyltransferase Aktivität

Die Hydroxamsäure Bildung wird durch 10-minütige Inkubation der Amidase bei 70 °C in einer Mischung aus 20 mM K-Na-Phosphat Puffer, pH 7,2, 100 µl einer
25 50-100 mM Amid- und 0,7 M Hydroxylaminlösung (eingestellt auf pH 7,0 unter Zugabe von 10 M NaOH) bestimmt. Die Hydroxylaminlösung wurde dazu frisch präpariert. Nach 30-minütiger Inkubation bei 50 °C – 70 °C wurden die Reaktionsbehälter auf Eis gestellt und 1 ml einer sauren Eisenchloridlösung (0.1 M FeCl₃ in 50 ml einer 0.5 M HCl-Lösung) zugegeben. Die erhaltene Menge an
30 Hydroxamat wurde spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 500 nm bestimmt.

Beispiel 6.1: Einfluss von Temperatur und pH-Wert

Die Temperaturabhängigkeit der Amidaseaktivität wurde unter Standardbedingungen bei pH 7.2 bestimmt. Dabei wurden die Reaktionstemperaturen zwischen 30 °C und 90 °C variiert.

5

Die Ergebnisse sind in Fig. 3 graphisch dargestellt, es wurde ein Temperaturoptimum bei ca. 70 °C ermittelt.

10

Weiterhin wurde die Temperaturstabilität der Enzyme zwischen 50 °C und 80 °C über einen längeren Zeitraum überprüft. Die isolierte Amidase zeigt eine ausgezeichnete thermische Stabilität bei 60 °C (obere Kurve, Fig. 5) und immer noch eine gute Stabilität bei 70 °C (mittlere Kurve, Fig. 5). Bei einer Reaktionstemperatur von 80 °C lässt die enzymatische Aktivität bei pH 7,2 allerdings schnell nach (untere Kurve, Fig. 5).

15

Das pH-Wert Optimum wurde anhand der Hydrolyse von Benzamid (5 mM) bei 70 °C in einem 50 mM Puffer aus Natriumacetat (für pH 2-5) oder Natriumphosphat (für pH 5-13), wobei der pH-Wert unter Verwendung von 10 M NaOH sukzessive bis auf pH 13 eingestellt wurde, durchgeführt.

20

Die Ergebnisse sind in Fig. 4 graphisch dargestellt, es wurde ein pH-Wert Optimum bei ca. 7 ermittelt.

Beispiel 6.2: Einfluss von Metallen und Inhibitoren

25

Zur Untersuchung des Einflusses bestimmter Reagenzien und Ionen auf die Amidaseaktivität wurde eine Lösung enthaltend 5 µg der Amidase und das Reagenz oder Ion 1 h bei 22 °C in 50 mM Phosphat-Puffer vorinkubiert.

30

Anschließend wurde eine 5 mM Lösung Benzamid in 50 mM Phosphat-Puffer zugegeben bis die Endkonzentration des Reagenz im Reaktionsansatz 1 mM betrug. Die Reaktion erfolgte 1 h bei 70 °C. Die katalytische Aktivität wurde wie oben beschrieben bestimmt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefasst:

Tab. 2:

Reagenz, 1mM	Amidaseaktivität in %
Cu^{2+}	26
Ni^{2+}	42
Zn^{2+}	93
Mg^{2+}	90
Ca^{2+}	85
Mn^{2+}	98
Fe^{2+}	80
Fe^{3+}	96
Ba^{2+}	87
Co^{2+}	0
EDTA	100
Iodacetamid	90
Iodacetat	22
SDS	100
Triton X-100	100
DTT	120

Beispiel 6.3: Untersuchung der Substratspezifität der isolierten Amidase

Die Substratspezifität der Amidase wurde bei drei unterschiedlichen Temperaturen unter Berücksichtigung des jeweils verwendeten Substrates getestet. Zur Hydrolyse von Aminosäureamiden wurde die Reaktionsmischung 3 h bei 30 °C umgesetzt, im Falle der aliphatischen und cyclischen Amide eine 1 h bei 50 °C und bei aromatischen Amidsubstraten 1h bei 70 °C. Die enzymatische Aktivität wurde dann, wie oben beschrieben, bestimmt. Als Kontrolle wurde jeder Ansatz ohne Enzym verwendet.

Die getesteten Substrate und die dazugehörige Amidaseaktivität sind in Tabelle 3 wiedergegeben:

5

Tab. 3

Substrat	Spezifische Aktivität ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
Aliphatische Amide	
Formamid	9.2
Harnstoff	17.5
Acetamid	15.7
N-methylharnstoff	--
Acrylamid	26.8
DL-Lactamid	18.9
Malonamid	7.4
Propionamid	25.4
Fumaranamid	--
Isobutyramid	13.5
Methacrylamid	23.5
Succinamid	4.0
Pivalinamid	14.9
Adipamid	12.0
Hexanamid	9.3
Cyclohexanamid	10.1
Aromatische Amide	
Sulfanylamid	--
2-Aminobenzamid	3.4
4-Aminobenzamid	6.5
Benzamid	19.4
o-Hydroxybenzamid	7.4
p-Hydroxybenzamid	12.1

N-Phenylharnstoff	--
Acetanilid	--
Benzylcarbamat	--
o-Tolylamid	--
m-Tolylamid	12.7
p-Tolylamid	13.1
2-Phenylpropionamid	15.8
3-Indolylacetamid	7.56
Heterocyclen	
Pyrazinamid	11.2
Nicotinamid	11.6
Isonicotinamid	7.1
Aminosäureamide	
L-Alaninamid	10.5
L-Methioninamid	14.4
L-Prolinamid	13.0
L-Valinamid	13.0
L-Leucinamid	10.8
L-Tryptophanamid	10.3
2-Hydroxy-4-(Methylthio)-buttersäureamid	5.7
L-tert.-Leucinamid	1.8

Beispiel 6.4: Untersuchung der Enantioselektivität der isolierten Amidase

- 5 Dazu wurden 10 µg der gereinigten Amidase mit einer 5 mM racemischen 2-Phenylpropionamid Lösung 3 h bei 70 °C inkubiert, wobei das Endvolumen des Reaktionsansatzes 500 µl betrug. In 30-minütigen Abständen wurden dem Reaktionsansatz Proben entnommen und durch eine HPLC-Messung analysiert. Die Produktbestimmung und die Quantifizierung der *R*- und *S*- Stereoisomere des

2-phenylpropionamids wurden durch Injektion definierter Mengen der entsprechenden Reinsubstanzen als Standard ermittelt. Der Enantiomerenüberschuss (ee) wurde anhand des Peakflächenverhältnisses erhalten durch die chirale HPLC-Messung errechnet ($ee^p = (S-R)/(S+R)$; $ee^p(\%) = (S-R)/(S+R) \times 100$; mit p = Produkt).

Für die HPLC Messungen wurde eine chirale Chirobiotic T Säule (Astec, Whippany, USA) benutzt. Als Solvent wurde Ethanol und 20 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,2 mit einem Volumenverhältnis von 20:80 eingesetzt. Die Elution erfolgte bei Raumtemperatur mit einer Flussgeschwindigkeit von $0,8 \text{ ml min}^{-1}$. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 210 nm. Die Ammoniak-Konzentration wurde mit der Phenol-hypochlorid Methode unter Verwendung des Ammoniak Kits Spectroquant 114752 (Merck, Deutschland) untersucht, wobei die freigesetzte Ammoniakmenge spektrometrisch unter Verwendung von Ammoniumchlorid als Standard bestimmt wurde.

Die Ergebnisse der Messungen sind in Fig. 7 graphisch dargestellt (*S*-Enantiomer obere Kurve; *R*-Enantiomer untere Kurve). Die gereinigte Amidase ist im Hinblick auf 2-Phenylpropionamid als Substrat hoch *S*-selektiv. Nach 60 Minuten war der Wert für den Enantiomerenüberschuss ee^p größer 95, bei einem Umsatz von 50%.

Patentansprüche:

- 5 1. Mono- oder multimeren Amidasen dadurch gekennzeichnet, dass die Amidase eine N-terminale Sequenz **SEQ ID No. 1** oder eine N-terminale Sequenz mit einer Homologie von über 50% zu **SEQ ID No. 1** enthält.
- 10 2. Mono- oder multimeren Amidasen dadurch gekennzeichnet, dass die Amidase eine Sequenz **SEQ ID No. 2** oder eine Sequenz mit einer Homologie von über 50% zu **SEQ ID No. 2** enthält.
- 15 3. Mono- oder multimeren Amidasen gemäß einem der Ansprüche 1 und 2 dadurch gekennzeichnet, dass die Amidase eine N-terminale Sequenz **SEQ ID No. 1** und die **SEQ ID No. 2** oder eine N-terminale Sequenz mit einer Homologie von über 50% zu **SEQ ID No. 1** und eine Sequenz mit einer Homologie von über 50% zu **SEQ ID No. 2** enthält.
- 20 4. Amidasen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 mit einem Molekulargewicht des nativen monomeren Enzyms zwischen 47 und 53 kDa.
- 25 5. Amidasen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym aus thermophilen Bakterien erhältlich ist.
- 30 6. Amidasen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym aus Actinomyceten erhältlich ist.
7. Amidasen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym aus *Pseudonocardia thermophila* erhältlich ist.
8. Amidasen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 erhältlich nach einem Verfahren umfassend die Verfahrensschritte

- a) Zentrifugation des zellfreien Rohextraktes eines thermophilen Bakteriums bei 10000 bis 20000 rpm und anschließende Zugabe einer 1 M Salzlösung,
- b) chromatographische Trennung des Überstandes an einer hydrophoben Säule mit einem reversen Gradienten einer Salzlösung von 1 M bis 0 M,
- c) Ultrafiltration der aus b) erhaltenen Fraktion, die Amidaseaktivität zeigt, an einer 10 kDa cut off Membran,
- d) Ionenaustauschchromatographie des aus c) erhaltenen Proteinfraction mit einem Gradienten von 0 M bis 0,5 M einer Salzlösung,
- e) Chromatographie der aus d) erhaltenen Fraktion, die Amidaseaktivität zeigt, mit einer 0,1%igen Salzlösung und entsalzen der gereinigten Amidasefraktion.

9. Amidasen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das N-terminale Ende der Amidase enthaltend die **SEQ ID No. 1** oder eine Sequenz mit einer Homologie von über 50% zu **SEQ ID No. 1** ganz oder teilweise deletiert ist.

10. Amidasen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die **SEQ ID No. 2** oder eine Sequenz mit einer Homologie von über 50% zu **SEQ ID No. 2** der Amidase ganz oder teilweise deletiert ist.

11. Amidasen nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym als Monomer oder als Trimer, bestehend aus drei monomeren Amidaseeinheiten gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, vorliegt.

12. Verwendung von Amidasen gemäß einem der vorherigen Ansprüche zur Hydrolyse von Amiden oder zur Acylierung.

13. Verwendung von Amidasen gemäß Anspruch 12 zur Hydrolyse von aliphatischen Amiden, aromatischen Amiden, cyclischen Amiden, heterocyclischen Amiden oder Aminosäureamiden.

5 14. Verwendung von Amidasen gemäß Anspruch 13 zur enantioselektiven Hydrolyse von Amiden.

15. Verwendung von Amidasen gemäß Anspruch 14 zur Herstellung von S-stereoisomeren Säuren.

10

16. Verfahren zur enzymatisch-katalytischen Hydrolyse von Amiden dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktion durch eine Amidase gemäß den Ansprüchen 1 bis 11 katalysiert wird.

15 17. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung bei einer Temperatur zwischen 30 °C und 85 °C durchgeführt wird.

20 18. Verfahren gemäß Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung bei einer Temperatur zwischen 50 °C und 75 °C durchgeführt wird.

25 19. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 16 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung bei einem pH-Wert zwischen 3,5 und 11,5 erfolgt.

Thermisch stabile Amidasen

5 Zusammenfassung:

Die Erfindung betrifft neue Amidasen, die aus thermophilen Bakterien isoliert werden können, insbesondere aus thermophilen Actinomyceten, wie z. B.

10 *Pseudonocardia thermophila*, wobei sich die erhaltenen Amidasen nicht nur eine hohe Temperaturstabilität besitzen sondern sich auch durch die enantioselektive Umsetzung eines breiten Substratspektrums auszeichnen.

Fig. 1

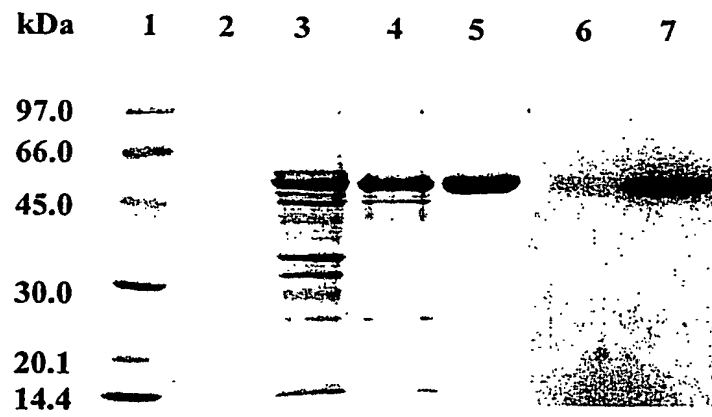


Fig. 2

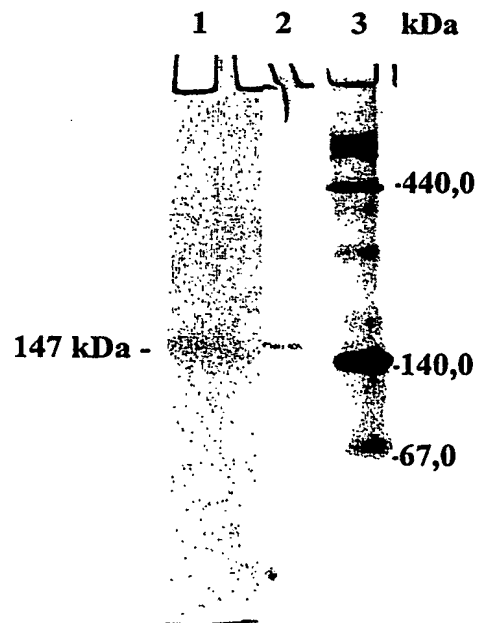


Fig. 3

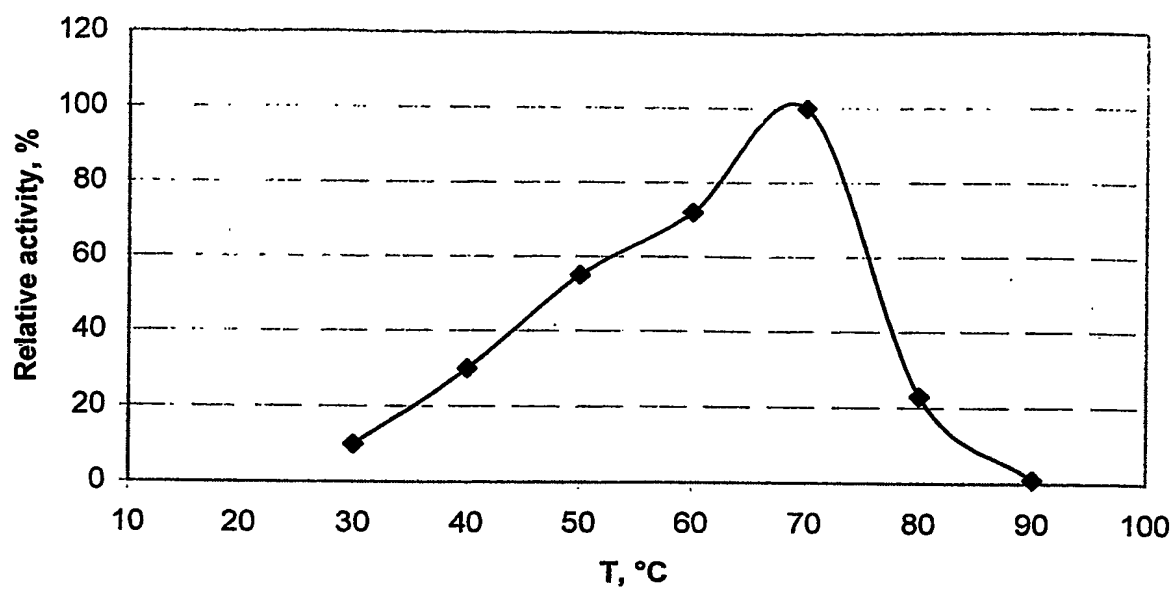


Fig. 4

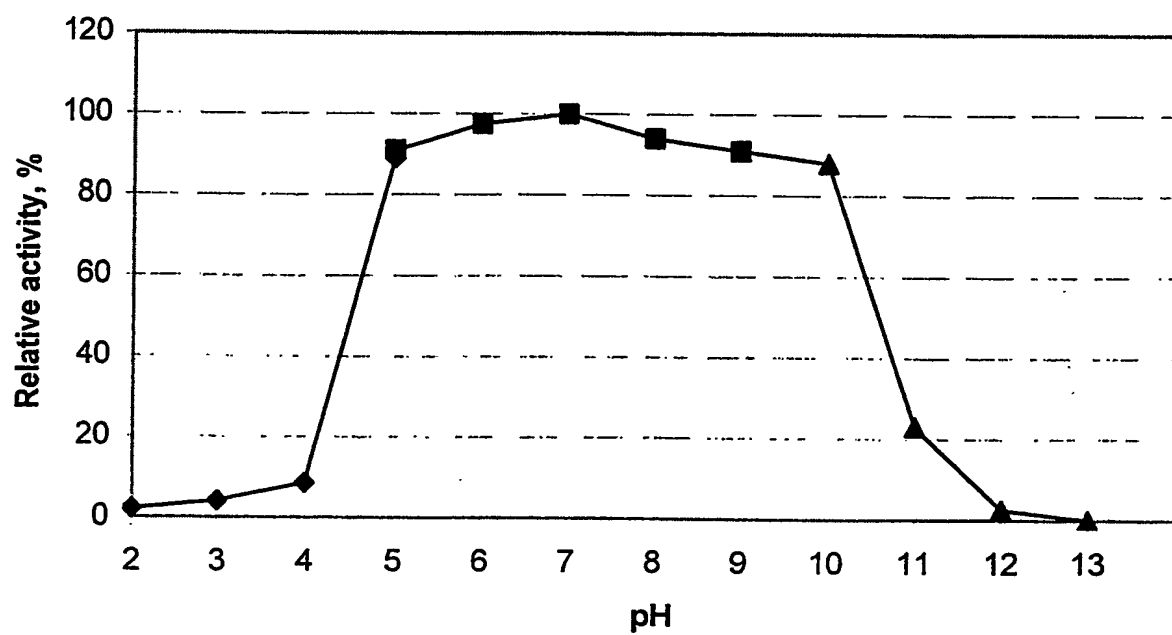


Fig. 5

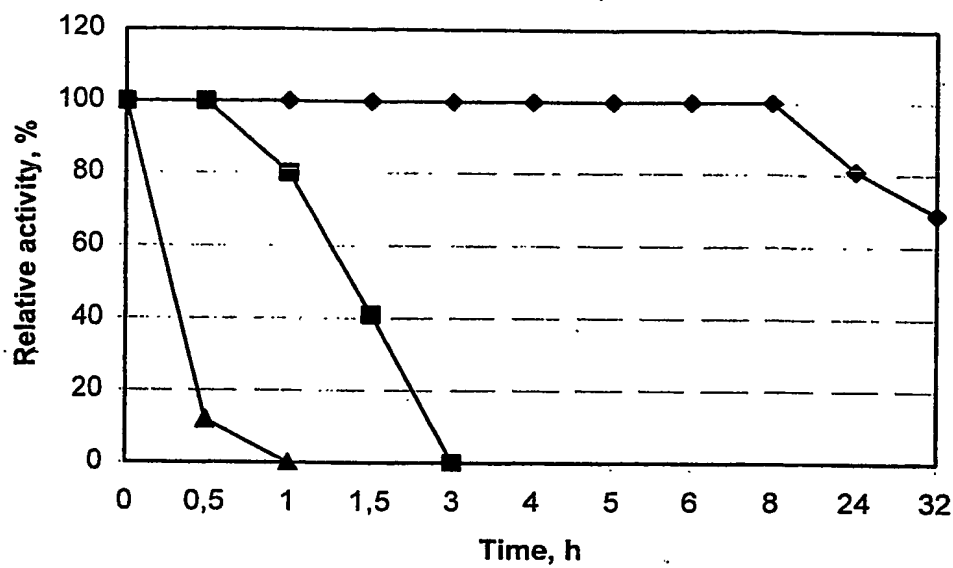


Fig. 6

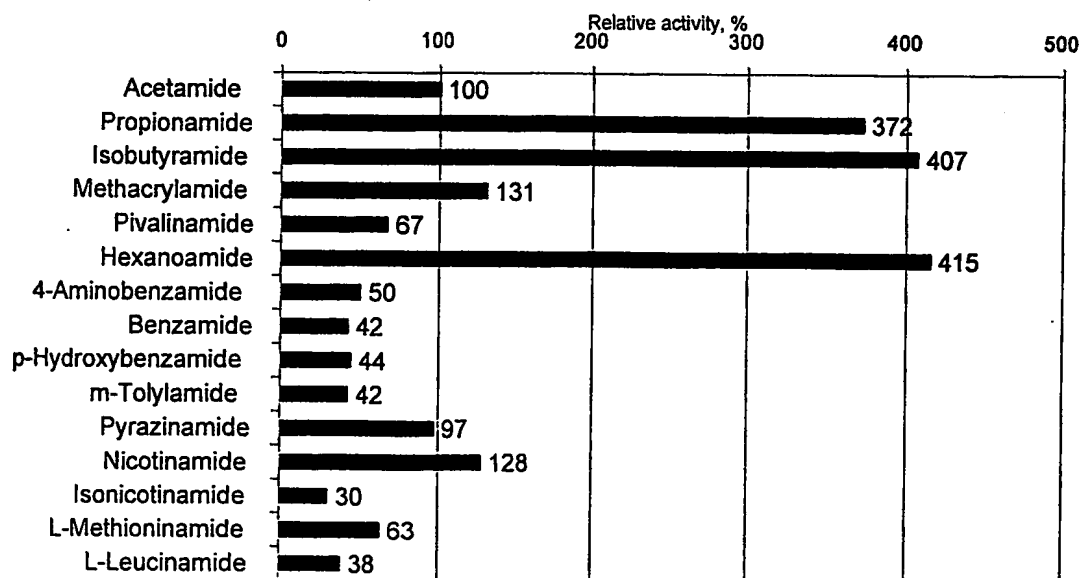
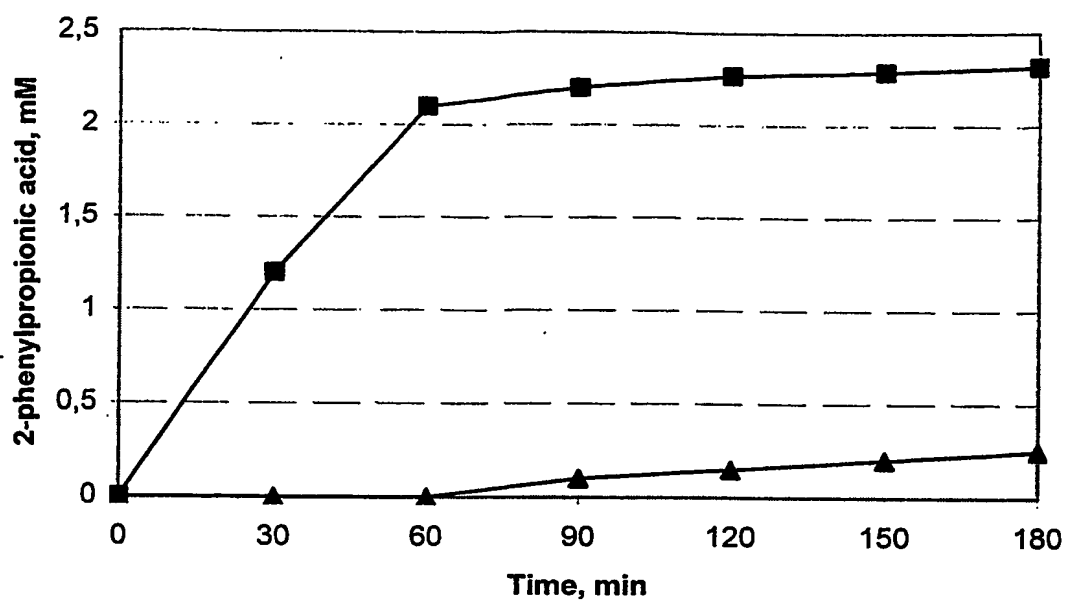


Fig. 7



SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa AG

<120> Thermisch stabile Amidasen

<130> 202dg07.de

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Pseudonocardia thermophila

<400> 1

Ile His Met Pro Asp Pro Asp Ala Val

1

5

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> Pseudonocardia thermophila

<400> 2

Asp Gly Leu Pro Val Gly Leu Met Ile Val Gly Lys His Phe

1

5

10